
学位論文

メカニカルストレス応答遺伝子オステオポンチンの 発現調節と機能に関する研究

藤原 慎視

キーワード：オステオポンチン，メカニカルストレス，トランスジェニックマウス，
ノックアウトマウス，GFP

Regulation and Function of Osteopontin in Response to Mechanical Stress

Shinji FUJIHARA

Abstract : Mechanical loading and endocrine system change bone architecture through the stimulation of bone remodeling by the action of a numbers of molecules. Recent investigations revealed that osteopontin (OPN) responds to mechanical loading in rats with an experimental system for tooth movement. However, the molecular mechanism of OPN expression in response to mechanical stress is unknown. Therefore, the purpose of this study was to understand the regulation and function of osteopontin in response to mechanical stress loading. Mechanical stress by the experimental tooth movement used orthodontic coil spring was loaded on wild-type mice, OPN knockout mice and transgenic mice lines carrying green fluorescence protein (GFP) under the control of 5.5 kbp length of OPN promoter (GFP-OPN5.5 mice). Furthermore, mechanical force by the motor-driven computer-controlled uniaxial cycle stretch system was loaded to the cultured osteoblasts obtained from calvariae of newborn GFP-OPN5.5 mice. For histological examination, the sections were routinely stained with haematoxylin and eosin (HE). To identify osteoclasts, sections were stained for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP). Expressions of endogenous OPN and GFP were examined by *in situ* hybridization and fluorescence examination. Morphological feature of osteoclasts in OPN knockout mice was compared with wild-type mice. A number of mono-nucleated TRAP positive cells were seen in OPN knockout mice, but multinucleated TRAP positive cells were much fewer. In addition, the size of resorbed area in bone matrix of OPN knockout mice was smaller than the ones of wild-type mice. In GFP-OPN5.5 mice, OPN and GFP mRNA expressing cells were detected in osteocytes, osteoblasts and osteoclasts after 72 hours of treatment, and the localization of GFP was consistent with that of endogenous OPN. Furthermore, similar increase of OPN mRNA and GFP expressing cells was recognized after 72 hours of stress loading on calvarial osteoblasts derived from GFP-OPN5.5 mice. These results indicate the impairment of bone remodeling due to the dysfunction of cell fusion in osteoclasts in OPN knockout mice. It is also suggested that OPN is required for the differentiation of osteoclast. Finally, it is revealed that the promoter region of OPN in response to mechanical stress lies in 5.5 kbp OPN promoter in the upstream region

緒 言

全身,あるいは局所に加わる種々のメカニカルストレスは,生体の骨代謝調節に大きな影響を及ぼす¹⁻³⁾。歯学領域では,歯に負荷される持続的なメカニカルストレスが破骨細胞による骨吸収,および骨芽細胞による骨形成を賦活化し,歯槽骨のリモデリングを引き起こすことが知られている^{4,5)}。この概念は矯正学的な歯の移動の生物学的背景を理解する上で重要と考えられる。

メカニカルストレスによって引き起こされる骨リモデリングには,多くの因子が関与する⁶⁾。その代表的なものとしては, cyclooxygenase-2 (COX-2), parathyroid hormone (PTH), protooncogene of FBV-MSV osteosarcoma (c-FOS) などが挙げられる⁷⁻⁹⁾。特に, 矯正学的な歯の移動時には prostaglandins (PG), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor-beta (TGF- β) などの種々の炎症性因子や細胞成長因子の発現が上昇し¹⁰⁻¹²⁾, 破骨細胞の誘導, 活性化を起点とした活発な骨リモデリングが生じると考えられている。さらに, これらの因子に加えて非コラーゲン性骨基質タンパクであるオステオポンチン (以下 OPN と略記する)¹³⁾ は, メカニカルストレス負荷時に上昇することが知られるようになった^{14,15)}。

OPN は骨から単離されたシアル酸に富むリン酸化糖蛋白であり, 骨細胞¹⁶⁾, 骨芽細胞¹⁷⁻¹⁹⁾, および破骨細胞^{18,20,21)} に発現が認められている。OPN の構造的特徴として, インテグリン $\alpha_v\beta_3$ と特異的に結合する Arg-Gly-Asp (RGD) アミノ酸配列を有していることが挙げられる²²⁻²⁴⁾。破骨細胞はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を発現しており, RGD 配列を介して骨表面へ接着することから^{23,25)} OPN が骨吸収に重要な役割を果たしていると考えられている。また, OPN にはアスパラギン酸が10個連続するアミノ酸配列が存在し, この領域を介してハイドロキシアパタイトと結合することによって石灰化を調節すると考えられている^{24,26,27)}。これらのことから, OPN が骨リモデリングに重要な役割を果たすことが示唆されている。

ラットに実験的な歯の移動²⁸⁾ を行い歯槽骨にメカニカルストレスを負荷すると, 歯槽骨内の骨細胞, 骨芽細胞および破骨細胞に OPN 遺伝子の発現を認め, 特に圧迫側歯槽骨内の骨細胞で OPN の劇的な上昇が観察されることが知られている¹⁵⁾。この結果は, OPN がメカニカルストレスに応答して引き起こされる骨リモデリングに重要な因子であることを示唆するものである。OPN 遺伝子の発現調節機構については未だ不明な点も多いが, これまでの研究から, そのプロモーター領域には shear stress-responsive element (以下 SSRE と略記する)²⁹⁾をはじめとするメカニカルストレス応答領域が存在し, さらに vitamin D receptor (VDR), runt-related gene (Runx-2), DNA binding protein to ets motif encoded by erythroblastosis virus E26 (ETS1), microphthalmia transcription factor

(MITF), transcription factor bind to PU box (PU.1) などの転写因子結合領域が存在すると報告されている³⁰⁻³⁴⁾。一方, 我々はさまざまな長さの OPN プロモーターにレポーター遺伝子を結合した導入遺伝子を作製し, それらを組み込んだトランスジェニックマウスを用いて OPN の細胞特異的なプロモーターの解析を行った。その結果, OPN プロモーター領域-5.5kbp をもつトランスジェニックマウスでは, レポーター遺伝子が骨芽細胞や軟骨細胞の分化過程において内因性の OPN と, きわめて類似した発現パターンを示すことを見いだした³⁵⁾。そこで本研究においては, OPN プロモーター領域-5.5kbp トランスジェニックマウスを用いてメカニカルストレスによる OPN の発現調節機構の解析を行うとともに, OPN 遺伝子ノックアウトマウスを用いて OPN の骨組織における機能の検討を行った。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

1) トランスジェニックマウス

OPN の転写開始部位を含む5.3 kbp *Bam*H1フラグメントを BALB/C マウスのゲノム DNA ライブラリー (Clontech, CA, U.S.A.) より単離し, DNA シークエンスによって OPN 遺伝子 (ヌクレオチド-5,505から-254) をコードすることを確認した。このフラグメントに, OPN ゲノム DNA の *Eco*RI フラグメントをライゲーションした後, 5.5kbp (-5,505 to +14), 3.1kbp (-3,155 to +14), 1.5kbp (-1,575 to +14), 0.9kbp (-910 to +14) の4つのフラグメントを作製し, それぞれにレポーター遺伝子として *green fluorescence protein* (GFP) 遺伝子を結合させた (図1 A)。それらを pBluescript I KS (-) plasmid にサブクローニングし, 制限酵素処理を行った後, アガロースゲル電気泳動により分離し, ゲルからバンドを切り出し精製を行った。その後, C57BL/6 \times DBA/2 F₁マウスの受精卵に移入してトランスジェニックマウスを作製した³⁵⁾。導入遺伝子については, OPN プロモーターのセンスプライマー (5'-CACTGAAGAA GCATCCTTGC-3') と GFP cDNA のアンチセンスプライマー (5'-TCTGCTGGTAGTGGTCGCGC-3') を設計し, polymerase chain reaction (PCR) を用いて確認した。作製されたトランスジェニックマウスは, C57BL/6 \times DBA/2 F₁マウスと交配した。本研究においては, OPN プロモーター領域-5.5kbp に GFP 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (GFP-OPN5.5 マウス; 363, 342の2系統) を用いて解析を行った。

2) ノックアウトマウス

OPN 遺伝子ノックアウトマウス (OPN ノックアウトマウス) は, Hogan らにより第5番染色体の OPN 遺伝子のエクソン4-7をネオマイシン耐性遺伝子 (以下 *Neo* と略記する) に置換して作製され³⁶⁾, C57BL/6 マウスと8世代以上交配が続けられた (図1 B)。ヘテロマウス

の交配によって生まれたマウスの遺伝子型については、尻尾から DNA を抽出した後、*OPN* 遺伝子のセンスプライマー (OPIn3; 5'-CCATACAGGAAAGAGAGACC-3') とアンチセンスプライマー (OPIn4; 5'-AACTGTTTGTCTGCATGCG-3'), ならびに *Neo^r* gene cassette のアンチセンスプライマー (Neo1360; 5'-CGTCCTGTAAGTCTGCAGAA-3') を用いて PCR を行い確認した。

2. 実験的歯の移動方法

実験動物には10週齢雄性のトランスジェニックマウス (GFP-*OPN*5.5 マウス), *OPN* ノックアウトマウス, および wild-type マウス (C57BL/6 マウス) を用いた。塩酸ケタミン (三共エール薬品, 東京) による麻酔を施した後, 矯正用コイルスプリングを用いた実験的歯の移動装置を装着した。コイルスプリングは Pavlin らの方法³⁷⁾ に準じ 0.0056 x 0.022 inch open coil spring (Rocky Mountain Orthodontics, CO, U.S.A.) を選択し, 約10 g の力を加えた。装着手順は, まず近心側断端を少し長めに調節したメタルプレートを用いて, 歯科用接着性レジンセメン

ト (F. Hセメント®, ニッシンデンタル, 京都) を用いて第一臼歯咬合面上に接着した。次に, フックの付いたメタルプレートを矯正用接着レジン (Super-Bond®, サンメディカル, 滋賀) を用いて切歯唇側面に接着し, 最後にそれぞれのメタルプレートをコイルスプリングで連結し, 第一臼歯に近心方向へのメカニカルストレスを負荷した。メカニカルストレス負荷24, 48, 72, 96, 168時間後にマウスを屠殺し, 第一臼歯周囲組織を含めた上顎骨を摘出し, 4 %パラホルムアルデヒド中で4℃, 16時間浸漬固定した。また, メカニカルストレスを負荷していない対照群として反対側第一臼歯周囲歯槽骨を用いた。

3. Micro-computed tomography (micro-CT) による三次元解析

メカニカルストレス負荷72, 168時間後のマウスより上顎骨を摘出し, 4 %パラホルムアルデヒド中で4℃, 16時間浸漬固定した。その後 PBS で洗浄し, X線画像計測システム (MIF-100®, 日立メディコ, 東京; 以下

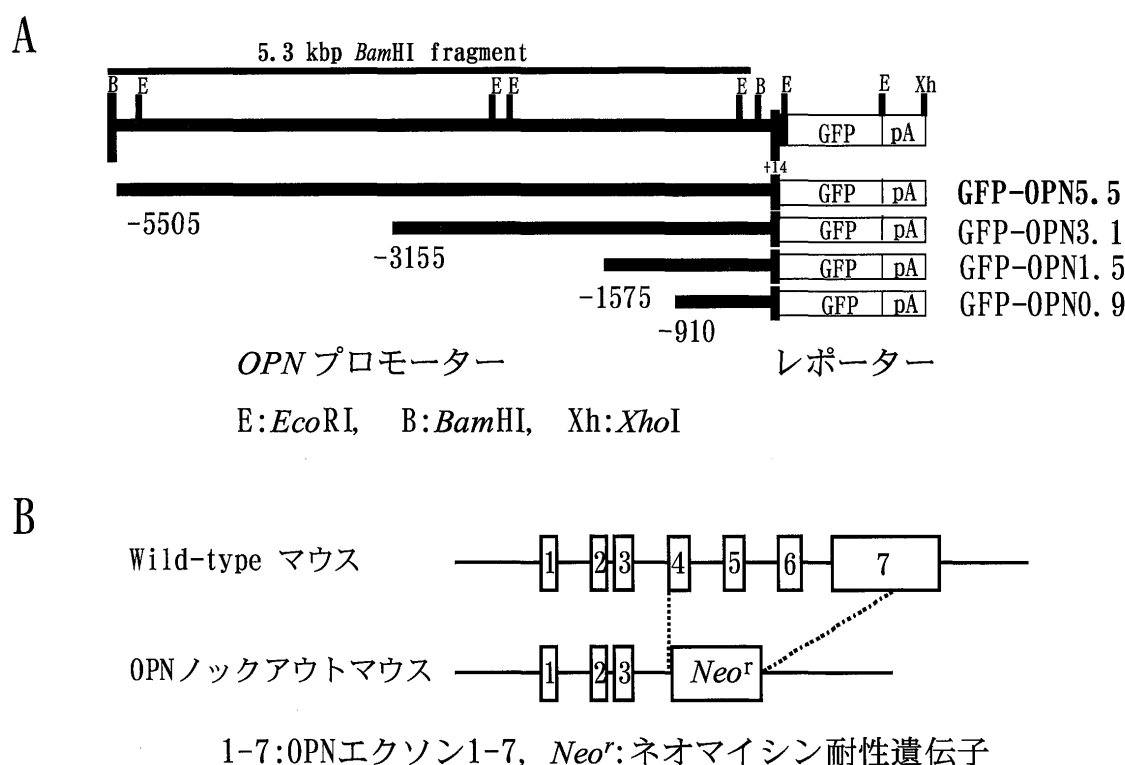


図1 遺伝子改変マウスの導入遺伝子構造, および遺伝子欠損部位

A: トランスジェニックマウスの導入遺伝子構造。 *OPN* の転写開始部位を含む5.3 kbp *Bam*HIフラグメントを単離し, これを元に5.5 kbp (-5,505 to +14), 3.1 kbp (-3,155 to +14), 1.5 kbp (-1,575 to +14), 0.9 kbp (-910 to +14) の4つの新しいフラグメントを作製し, それぞれに *GFP* 遺伝子を結合させた。pA: ウサギ β -globin 遺伝子の poly A シグナル。

B: *OPN* ノックアウトマウスの遺伝子欠損部位。第5番染色体の *OPN* 遺伝子のエクソン4-7をネオマイシン耐性遺伝子 (*Neor*) に置換した。

(Higashibata ら³⁵⁾ の報告, Liaw ら³⁶⁾ の報告より改変引用)

micro-CT とする) を用いて上顎第一臼歯および周囲歯槽骨部を撮影した。得られたデータを高速画像処理システム (HSIP-R®, 日立メディコ) を用いて立体構築し、歯の移動様相について観察を行った。

4. 組織学的解析

メカニカルストレス負荷24, 48, 72, 168時間後のマウスの上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド中で4℃, 16時間浸漬固定した。固定標本をエタノール脱水, クロロホルム脱脂し, 再び加水を行った後, 19% EDTA (pH 7.4) にて2週間脱灰を行った。さらにエタノール脱水を行った後パラフィン包埋し, 厚さ3μmの薄切切片を作製した。

標本染色は, haematoxylin and eosin (HE) 染色, または破骨細胞の同定を行うために酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色 (Acid phosphatase, Leukocyte kit®, Sigma, MO, U.S.A.) を行い, *OPN* 遺伝子および *GFP* 遺伝子の発現解析として *in situ* hybridization 法を行った。

5. *In situ* hybridization 法

Nomura らの方法³⁸⁾ に準じて以下の通り行った。

薄切した切片標本に対する前処理として, キシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール系列を用いた加水処理を加え, proteinase K (2 μg/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) による酵素処理を行った。4%パラホルムアルデヒドで10分間固定, エタノールにて脱水した後, 50%ホルムアミドで湿潤させ密閉したモイスターチャンバー内で50℃, 16時間ハイブリダイゼーションを行った。プローブはジゴキシゲニン (DIG) で標識された *OPN* cRNA プローブ (167-982; 終濃度0.02 μg/μl), および *GFP* cRNA プローブ (700-1370; 終濃度0.12 μg/μl) の2種類を用いた。反応後, RNaseA (10 μg/ml, Roche Diagnostics GmbH) により過剰のプローブを分解, 洗浄し, 免疫組織化学反応によりシグナルの検出を行った。

6. 連続切片の再構築による三次元解析

第一臼歯部水平面断の連続切片を作製し, HE 染色を行った。これらの組織像をベクトルグラフィック編集ソフトウェア (Adobe Illustrator®, Adobe Systems, CA, U.S.A.) を用いてトレースし, 三次元ソフトウェア (STRATA 3D Pro®, ソフトウェア・トゥー, 東京) にて第一臼歯の再構築を行った。メカニカルストレス負荷0, 48, 72, 168時間後の標本から連続切片をそれぞれ5枚間隔で選択し, *in situ* hybridization 法を行った。歯の三次元像上に *OPN* 遺伝子を発現している骨細胞および骨芽細胞をプロットし, 細胞種別の局在の経時的変化を解析した。同様に, *OPN* ノックアウトマウスにおいてもメカニカルストレス負荷0, 72, 168時間後の標

本を用い, HE 染色像で破骨細胞を同定し, 三次元的局在パターンを解析した。また, 得られた三次元像内の *OPN* 陽性骨細胞, *OPN* 陽性骨芽細胞および破骨細胞を圧迫側と牽引側の2群に分類し, 細胞数の算定を行った。なお, マウスの上顎第一臼歯の歯根はセメント質が肥大して先端部が太くなっており, 歯の傾斜移動の回転中心はほぼ根尖に一致するため, 今回の実験では移動した歯根の近心側2分の1をすべて圧迫側, 遠心側2分の1を牽引側と定義した。また, 咬合力が加わる根尖直下は圧迫側とした。なお, メカニカルストレスを負荷していない対照群については, 他の群と算定部位を一致させるため, 近心側を圧迫側, 遠心側を牽引側として表示した。

7. 初代培養の骨芽細胞に対するメカニカルストレス負荷

1~2日齢の GFP-*OPN*5.5 マウスの頭蓋冠より初代培養の骨芽細胞を調整し, α-MEM (10% FBS) 培地で37℃, 5% CO₂, 95% 空気的环境下にて2週間培養した。その後, 10% コラーゲンゲル (Cellmatrix Type I-A®, 新田ゼラチン, 大阪) でコートしたシリコンチャンバー上 (3×3 cm) で約 2×10⁵ cells/chamber になるまで培養を行い, 周期的一軸性伸展刺激を発生する培養細胞伸展システム (STRETCH NS-300®, スカラテック, 大阪) を用い, これらの細胞に2種類の条件下でメカニカルストレスを負荷した。第1の条件としては, 細胞が接着したシリコンチャンバーを伸展率が1.2倍になるまで伸展し, その後0.22 Hzの周期でメカニカルストレス (以下伸展刺激という) を加えた。第2の条件としては, あらかじめ1.2倍まで伸展したシリコンチャンバー上で細胞がコンフルエントの状態になるまで培養を行い, その後チャンバーを元の状態に復元し, 同様の周期でメカニカルストレス (以下圧縮刺激という) を加えた。メカニカルストレス負荷72時間後, 細胞を1%ホルマリン溶液で10分間固定し, *in situ* hybridization 法による *OPN* 遺伝子の発現解析, および蛍光実体顕微鏡 (波長510 nm, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いた GFP の自家蛍光発現解析を行った。

結 果

1. マウスの歯槽骨にメカニカルストレスを負荷する実験系の確立

マウスの上顎第一臼歯と切歯の間にコイルスプリングを装着し, 第一臼歯周囲歯槽骨に圧迫力, および牽引力を加える実験系の確立を試みた (図2)。Micro-CTにより撮影された画像を三次元構築して観察を行ったところ (図3), メカニカルストレスを負荷していない対照群 (図3B) では第一臼歯と第二臼歯の間に間隙は存在しなかったが, メカニカルストレス負荷72時間後 (図3C), 168時間後 (図3D) においてともに間隙が認められ, 第一臼歯が近心に向かって移動している様相が確認された。

次に、歯の移動に伴う第一臼歯周囲歯槽骨の組織学的変化を観察した(図4)。歯根部の水平面断切片のHE染色像において、メカニカルストレスを負荷していない対照群(図4 A, B, C)では第一臼歯歯根周囲の歯根膜がほぼ均等な厚さとなっていた。72時間後(図4 D, E, F)になると圧迫側において歯根膜の圧縮と破骨細胞の出現、およびそれに伴う歯槽骨の吸収が認められ、観察期間中で組織学的変化が最も著しかった。牽引側では歯根膜の伸展がみられた。また、168時間後(図4 G, H, I)では牽引側で骨新生が認められるようになり、メカニカルストレスに伴う骨のリモデリングが確認された。

2. メカニカルストレス負荷に伴う破骨細胞数の変化とOPN遺伝子の発現解析

組織学的変化が顕著であったメカニカルストレス負荷72時間後において、破骨細胞数、およびOPN遺伝子

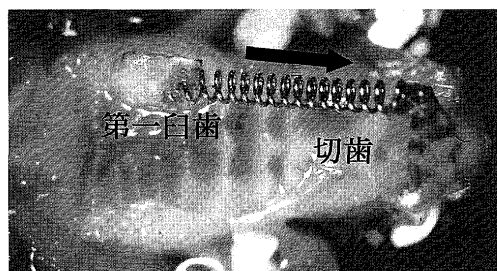


図2 マウスを用いた歯の移動実験系

上顎切歯と第一臼歯にあらかじめメタルプレートを接着し、両者を矯正用コイルスプリングで連結して第一臼歯に近心方向(矢印)へのメカニカルストレスを負荷した。

発現様相の解析を行った(図5)。破骨細胞についてTRAP染色により検索を行ったところ、メカニカルストレスを負荷していない対照群(図5 B)と比較して、圧迫側歯槽骨表面、および骨髓腔内においてTRAP陽性多核の破骨細胞数の著しい増加を認めた(図5)。OPN遺伝子の発現について*in situ* hybridization法による検索を行ったところ、対照群(図5 D)ではほとんど発現は認められなかったのに対し、歯槽骨内の骨細胞、骨芽細胞

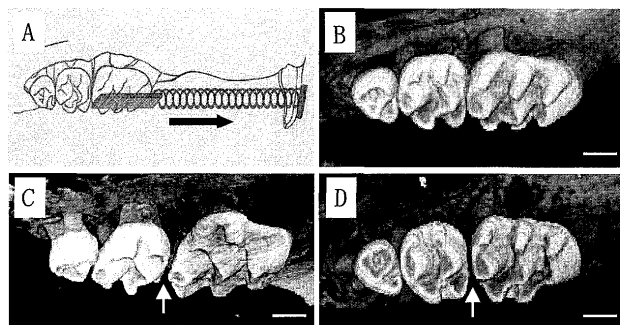


図3 Micro-CT 三次元構築像によるメカニカルストレス負荷時の第一臼歯近心移動

X線画像計測システムによる臼歯および周囲歯槽骨部の撮影像をもとに、高速画像処理システムを用いて三次元構築を行った。

A: 歯の移動装置の模式図。黒矢印は第一臼歯の牽引方向を示す。B: 対照群のmicro-CT三次元構築像。C: メカニカルストレス負荷72時間後のmicro-CT三次元構築像。D: メカニカルストレス負荷168時間後のmicro-CT三次元構築像。72時間後と168時間後では、第一臼歯と第二臼歯の間に間隙が生じている(白矢印)。

Bars = 500 μ m (B, C, D)

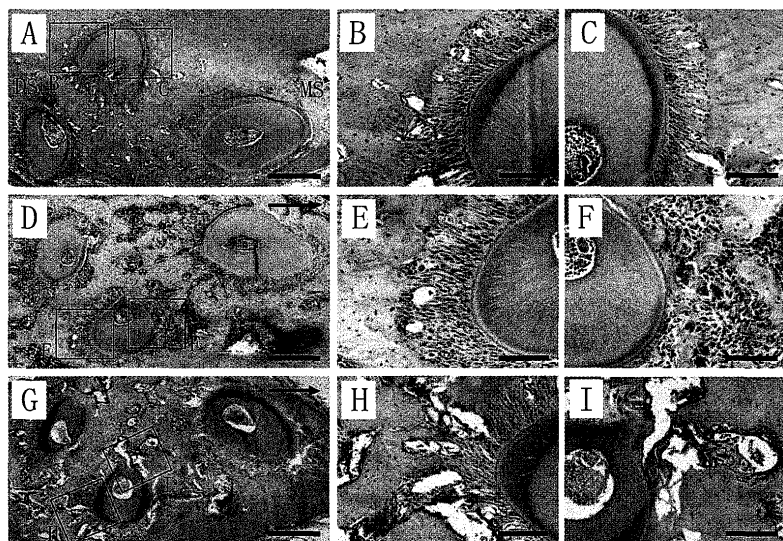


図4 歯の移動に伴う第一臼歯周囲の組織学的変化

A, B, C: 対照群のHE染色像。D, E, F: メカニカルストレス負荷72時間後における第一臼歯周囲組織のHE染色像。G, H, I: メカニカルストレス負荷168時間後における第一臼歯周囲組織のHE染色像。B, CはAの拡大像。E, FはDの拡大像。H, IはGの拡大像。それぞれ遠心口蓋側根における近心側(C)と遠心側(B), および圧迫側(F, I)と牽引側(E, H)を示す。MS: 近心。DS: 遠心。矢印は第一臼歯の牽引方向を示す。

Bars = 500 μ m (A, D, G), 100 μ m (B, C, E, F, H, I)

および破骨細胞に *OPN* 遺伝子の発現を認めた(図5 C)。

3. *OPN* 陽性細胞の経時的な三次元分布変化

歯の移動時の第一臼歯周囲歯槽骨における *OPN* 陽性細胞の三次元分布, およびその数の経時変化を観察した(図6)。連続切片を5枚間隔で選択し, *OPN* cRNA プローブを用いて *in situ* hybridization 法を行い *OPN* 陽性骨細胞と *OPN* 陽性骨芽細胞を同定し, それぞれの分布を立体模式的に表示した(図6 A)。また重複した細胞を除外した後, *OPN* 陽性細胞の数を算定した(図6 B)。その結果, メカニカルストレス負荷48時間後に圧迫側の *OPN* 陽性骨細胞の数が上昇し, その後72時間後までその数は増加したが, 歯の移動に伴ってメカニカルストレスが低下する168時間後では逆に減少した(図6 A b, c, d, 6 B a)。 *OPN* 陽性骨芽細胞も同様に, 圧迫側で72時間後まで増加した後, 168時間後では減少していた(図6 A f, g, h, 6 B b)。一方, 牽引側では圧迫側と比較して常に同等ないしはそれ以上の *OPN* 陽性骨芽細胞が観察されたが, *OPN* 陽性骨細胞については牽引側の方が明らかに少なかった。

OPN 陽性骨細胞, *OPN* 陽性骨芽細胞および破骨細胞の出現分布を重ね合わせ, それぞれの三次元的な局在を観察した(図7)。その結果, メカニカルストレス負荷48時間後(図7 B), 72時間後(図7 C)で *OPN* 遺伝子を発現する骨細胞の周囲に破骨細胞が多く集積している様相が観察された。

4. *OPN* ノックアウトマウスにおける骨リモデリングの低下

Wild-type マウスおよび *OPN* ノックアウトマウスの第一臼歯周囲歯槽骨内に存在する破骨細胞の三次元分布とその数の変化を観察した(図8)。メカニカルストレスを負荷していない対照群について破骨細胞の観察を行ったところ, wild-type マウスでは遠心側(細胞数は牽引側として算定)に比較的多くその局在が観察されたのに対し(図8 A a, 8 B a), *OPN* ノックアウトマウスでは遠心側と近心側(細胞数は圧迫側として算定)で顕著な差を認めなかった(図8 A d, 8 B b)。第一臼歯近心側, および遠心側の周囲歯槽骨内に存在する破骨細胞数の総計は, *OPN* ノックアウトマウスの方が wild-type マウスと比べて多かった(図8 A a, d, 8 B a, b)。メカニカルストレス負荷に伴い出現する破骨細胞の経時変化は, wild-type マウスの圧迫側で72時間後に急激な増加を認め, 168時間後で減少した(図8 A b, c, 8 B a)。一方これとは対照的に, *OPN* ノックアウトマウスにおける破骨細胞数は168時間後まで緩徐な増加を示したものの, wild-type マウスのような著しい変化は認めず, 圧迫側と牽引側でほとんど差は観察されなかった(図8 A e, f, 8 B b)。

OPN ノックアウトマウスと wild-type マウスを用いて,

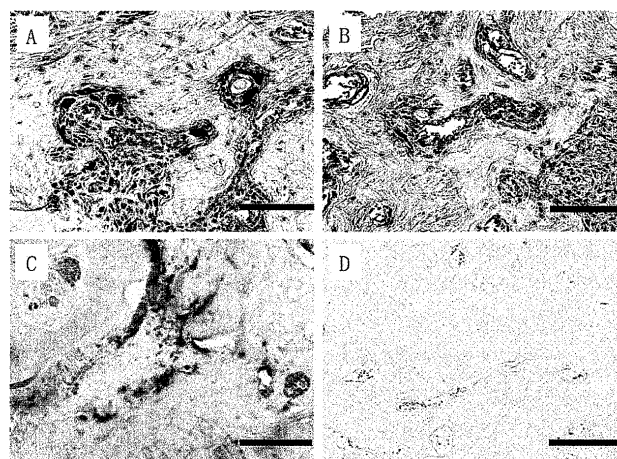


図5 メカニカルストレス負荷に伴う破骨細胞数の変化および *OPN* 遺伝子の発現様相

メカニカルストレス負荷72時間後と対照群の切片を用い, TRAP 染色により破骨細胞の検索を行い, *in situ* hybridization 法により *OPN* 遺伝子発現様相を解析した。

A: メカニカルストレス負荷72時間後における第一臼歯遠心口蓋側根圧迫側の TRAP 染色像。B: 対照群の TRAP 染色像。Bと比較してAでは, 圧迫側歯槽骨に破骨細胞が出現し, 骨吸収が認められる。C: メカニカルストレス負荷72時間後における第一臼歯遠心頬側根圧迫側の *OPN* 遺伝子発現様相。D: 対照群の *OPN* 遺伝子発現様相。Dと比較して, Cでは圧迫側歯槽骨に *OPN* 遺伝子発現細胞が認められる。

Bars = 100 μ m (A-D)

メカニカルストレス負荷に伴い出現する TRAP 陽性細胞を, メカニカルストレス負荷72時間後において比較検討した(図9)。Wild-type マウス(図9 A, B, C)では, メカニカルストレス負荷に伴い圧迫側歯槽骨に多数の破骨細胞が出現し, 著明な骨吸収像が観察されたが(図9 B), *OPN* ノックアウトマウス(図9 D, E, F)ではこのような組織学的所見は観察されなかった(図9 E)。また, wild-type マウスの骨髓腔内でも成熟した破骨細胞による活発な骨吸収が観察されたが(図9 C), *OPN* ノックアウトマウスでは破骨細胞前駆細胞と考えられる TRAP 陽性単核細胞が多く認められるものの, 成熟した破骨細胞はほとんど観察されなかった(図9 F)。一方, 少数存在する TRAP 陽性多核細胞の大きさは wild-type マウスのそれと比較して小さく, 核の数も少ない傾向が観察された。これらのことから, *OPN* を欠失した環境下でメカニカルストレスに伴って出現する破骨細胞は, その分化過程に何らかの異常を生じ, 多核化が阻害され骨吸収能に乏しい表現型を示す可能性が示唆された。

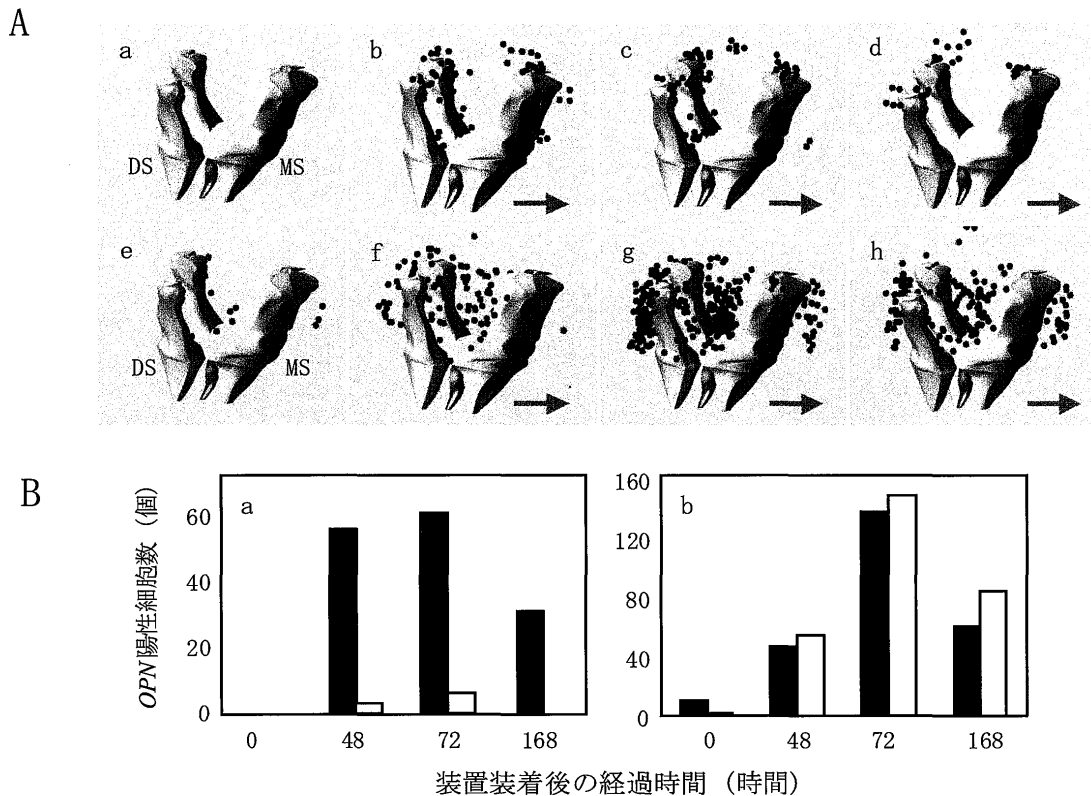


図6 第一臼歯周囲歯槽骨における *OPN* 陽性細胞の三次元的局在とその数の経時的変化

第一臼歯部水平断面の連続切片の再構築により歯の三次元像を作製し、そこに *in situ* hybridization 法により *OPN* 遺伝子を発現していることが確認された骨細胞と骨芽細胞をプロットし、細胞種別の局在の経時の変化を解析した。三次元像上の *OPN* 陽性細胞を圧迫側と牽引側に分類し、細胞数の算定を行った。

A: メカニカルストレス負荷に伴って出現する *OPN* 陽性骨細胞 (a-d) および *OPN* 陽性骨芽細胞 (e-h) の三次元的局在。a, e: 対照群。b, f: メカニカルストレス負荷48時間後。c, g: メカニカルストレス負荷72時間後。d, h: メカニカルストレス負荷168時間後。MS: 近心。DS: 遠心。矢印は第一臼歯の牽引方向を示す。

B: Aで示されたそれぞれの *OPN* 遺伝子を発現している細胞数の経時の変化。a: *OPN* 陽性骨細胞数。b: *OPN* 陽性骨芽細胞数。この中で、黒い bar: 圧迫側の細胞数。白い bar: 牽引側の細胞数。移動した根の近心側1/2を圧迫側、遠心側1/2を牽引側とし、対照群については、近心側を圧迫側、遠心側を牽引側として算定した。

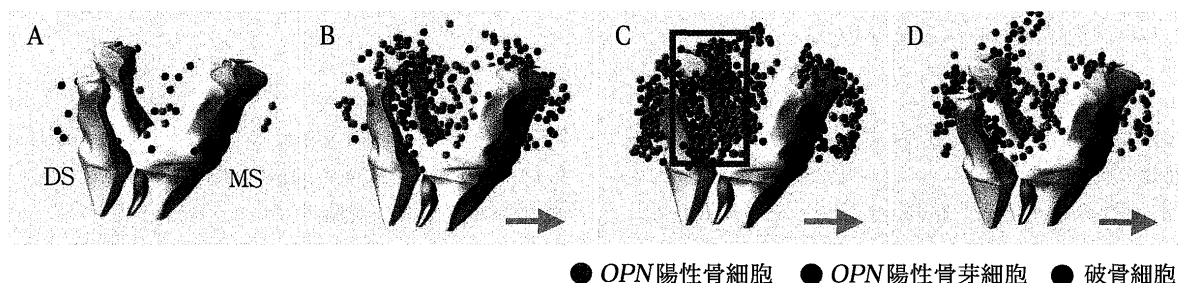


図7 *OPN* 陽性骨細胞, *OPN* 陽性骨芽細胞および破骨細胞の局在比較

OPN 陽性骨細胞, *OPN* 陽性骨芽細胞および破骨細胞の三次元的な局在を明らかにするため、それぞれの出現分布を重ね合わせて観察した。

A: 対照群。B: メカニカルストレス負荷48時間後。C: メカニカルストレス負荷72時間後。D: メカニカルストレス負荷168時間後。メカニカルストレス負荷72時間後 (C) において、四角内の *OPN* 陽性骨細胞の周囲に破骨細胞の顕著な増加が認められた。MS: 近心。DS: 遠心。矢印は第一臼歯の牽引方向を示す。

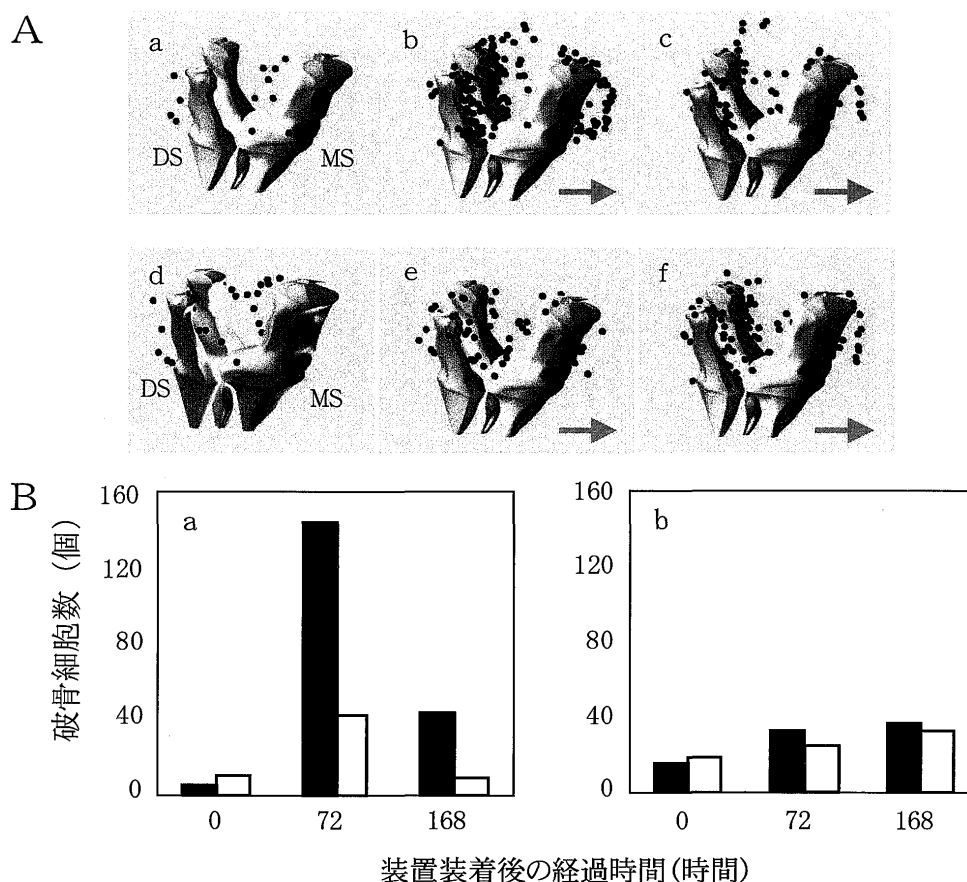


図8 Wild-type マウスと OPN ノックアウトマウスの第一臼歯周囲歯槽骨における破骨細胞の三次元的局在とその数の変化

第一臼歯部水平面断の連続切片の再構築により歯の三次元像を作製し、そこに破骨細胞をプロットし、三次元的局在パターンを解析した。三次元像上の細胞を圧迫側と牽引側に分類し、細胞数の算定を行った。

A:メカニカルストレス負荷に伴って出現する wild-type マウス(a-c)および OPN ノックアウトマス(d-f)の破骨細胞の三次元的局在。a, d:対照群。b, e:メカニカルストレス負荷72時間後。c, f:メカニカルストレス負荷168時間後。MS:近心。DS:遠心。矢印は第一臼歯の牽引方向を示す。

B:Aで示されたそれぞれの破骨細胞数の経時的変化。a:Wild-type マウス。b:OPN ノックアウトマウス。この中で、黒い bar:圧迫側の細胞数。白い bar:牽引側の細胞数。移動した根の近心側 1/2 を圧迫側、遠心側 1/2 を牽引側とし、対照群については、近心側を圧迫側、遠心側を牽引側として算定した。Wild-type マウス(a)では、72時間後の圧迫側において著しい増加が認められ168時間後では減少しているが、OPN ノックアウトマウス(b)では、経時的に増加しているものの、wild-type マウスでみられるような72時間後での著しい増加は認められなかった。

5. メカニカルストレスに応答する OPN プロモーター領域の解析

OPN プロモーター領域の解析を行うため、GFP-OPN5.5 マウス (363) を用いてメカニカルストレス負荷実験を行った (図10)。メカニカルストレス負荷72時間後の2枚の連続切片で、それぞれ異なるプローブ (OPN cRNA プローブ, GFP cRNA プローブ) を用いて *in situ* hybridization 法を行い、内因性 OPN (図10A, B) と GFP (図10C, D) の発現の比較を行ったところ、骨細胞、骨芽細胞、および破骨細胞における陽性シグナルの発現パターンは、牽引側におけるごく少数の細胞を

除くほぼすべての細胞でよく一致していた。これと同様の結果は、他の系統の GFP-OPN5.5 マウス (342) でも観察された (結果省略)。

さらに、*in vitro* においてメカニカルストレスに応答する OPN プロモーター領域の解析を行うため、GFP-OPN5.5 マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞に周期的伸展刺激および圧縮刺激を負荷し、GFP と内因性 OPN 遺伝子の発現を自家蛍光発現解析および *in situ* hybridization 法にて検索した (図11)。周期的伸展刺激 (図11B) あるいは圧縮刺激 (図11C) を72時間負荷した細胞においてまず GFP の自家蛍光発現解析を行ったとこ

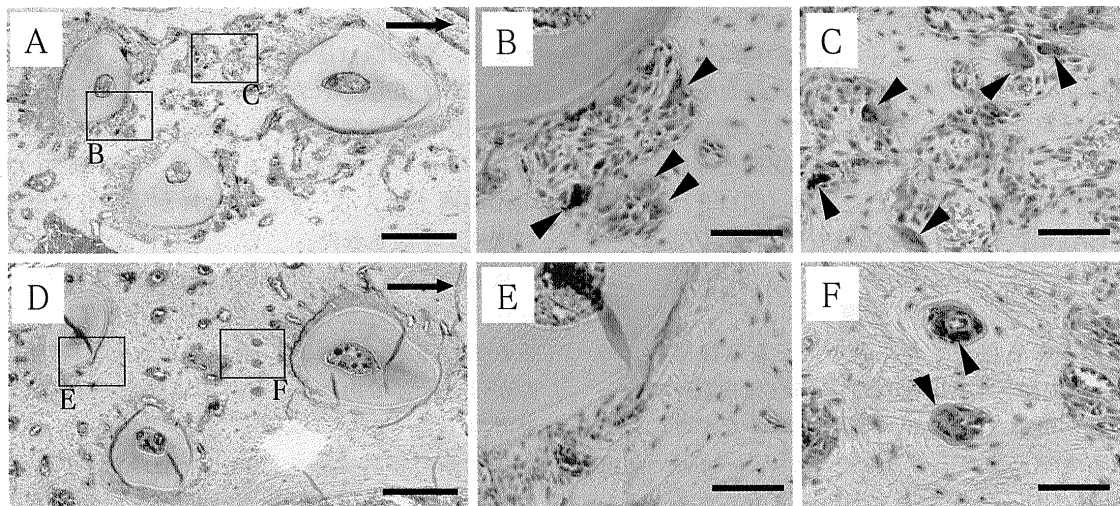


図9 OPN ノックアウトマウスに対するメカニカルストレス負荷による TRAP 陽性細胞の出現

Wild-type マウスと OPN ノックアウトマウスのメカニカルストレス負荷72時間後のそれぞれの切片に TRAP 染色を行い、TRAP 陽性細胞の比較検討を行った。

A-C: Wild-type マウスのメカニカルストレス負荷72時間後における TRAP 染色像。D-F: OPN ノックアウトマウスのメカニカルストレス負荷72時間後における TRAP 染色像。B, E: それぞれAとDの遠心頬側根圧迫側の拡大像。C, F: 骨髓腔の拡大像。矢印は第一臼歯の牽引方向、矢頭は TRAP 陽性多核細胞を示す。

Bars = 500 μ m (A, D), 100 μ m (B, C, E, F)

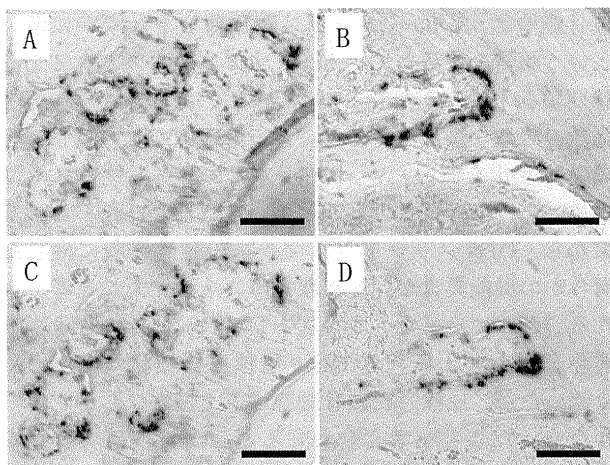


図10 GFP-OPN5.5 マウスにおけるメカニカルストレスに応答するレポーター遺伝子の発現

GFP-OPN5.5 マウスのメカニカルストレス負荷72時間後の2枚の連続切片で、それぞれ異なるプローブ (OPN cRNA プローブ, GFP cRNA プローブ) を用いて in situ hybridization 法を行い、内因性 OPN と GFP の発現の比較を行った。

A, B: OPN 遺伝子発現様相。C, D: GFP 遺伝子発現様相。A, C: 牽引側。B, D: 圧迫側。

Bars = 50 μ m

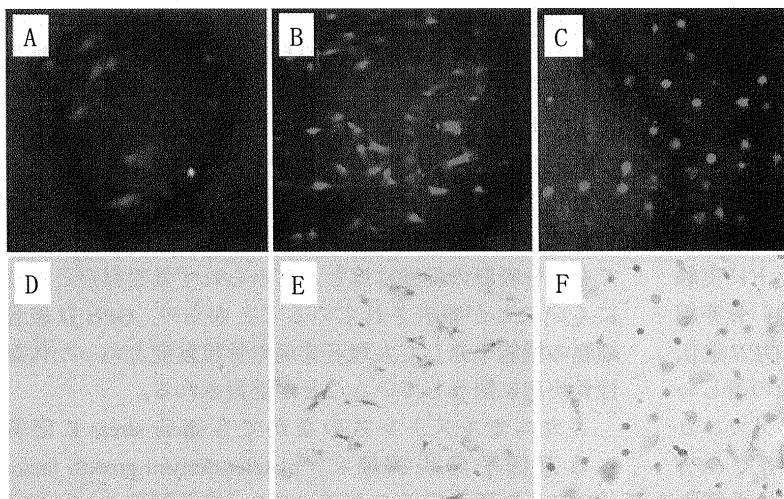


図11 GFP-OPN5.5 マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞におけるメカニカルストレスに応答した OPN 遺伝子および GFP の発現

GFP-OPN5.5 マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞に周期的伸展刺激および圧縮刺激を負荷し、GFP と内因性の OPN 遺伝子の発現を自家蛍光発現解析および in situ hybridization 法にて検索した。

A-C: 自家蛍光発現解析による GFP の発現。D-F: OPN 遺伝子の発現。A, D: 対照群。B, E: 周期的伸展刺激72時間。C, F: 周期的圧縮刺激72時間。周期的伸展刺激 (B, E) および周期的圧縮刺激 (C, F) により GFP と OPN 遺伝子の発現上昇が同時に認められた。

ろ、対照群（図11A）と比較して GFP 陽性細胞数の明らかな上昇が確認された。次に、同一の細胞に対して *in situ* hybridization 法により *OPN* 遺伝子の発現解析を行ったところ、対照群の細胞（図11D）では *OPN* 遺伝子の発現はほとんど認められなかったが、周期的伸展刺激あるいは圧縮刺激を72時間負荷した細胞（図11E, F）では、*OPN* 陽性細胞数は明らかに増加していた。

考 察

OPN 遺伝子の発現がメカニカルストレス負荷によって上昇することは、骨肉腫由来骨芽細胞様細胞やニトリ骨芽細胞を用いた *in vitro* の実験においてすでに報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。また、マウスを用いた *in vivo* の尾部懸垂実験においては、大腿骨におけるメカニカルストレス減少によって骨吸収の亢進ならびに骨形成の低下が観察されるのに対し、*OPN* ノックアウトマウスに対して同様の実験を行ってもこのような変化はみられないことが知られている^{42, 43)}。このように、メカニカルストレスによって引き起こされる骨リモデリングに *OPN* が深く関与している可能性が種々の実験系で明らかとなりつつある。そこで本研究では、メカニカルストレスを介する骨代謝調節機構における *OPN* の関与についてより詳細な解析を行うため、遺伝子改変動物を用いた歯の移動実験系を確立し、分子組織学的な解析を行った。

本研究で用いられたマウスの歯の移動実験系は、過去に報告されたコイルスプリングを使用する系³⁷⁾に改良を加えて考案されたものである。Micro-CT による三次元構築像や組織学的解析法を用いた検討においては、メカニカルストレス負荷に伴う時間経過とともに周囲歯槽骨に骨リモデリングが確認され、第一臼歯が近心へ移動する様相が観察された。また、移動量の個体差はほとんど認められず、十分な再現性を有すると判断され、この実験系がメカニカルストレスによって引き起こされる骨リモデリングの分子メカニズムの解析に有用な方法であると考えられた。しかし、歯の移動に伴い多数の破骨細胞が歯槽骨髄腔内に出現して穿下性骨吸収⁴⁴⁾も認められたため、臨床的な歯の移動実験モデルとしてはやや過大な力が加わった可能性も否定できない。

これまで行われてきたメカニカルストレスに応答した *OPN* 遺伝子発現に関する研究の多くは、二次元的な組織学的解析によるものであった。そこで本研究においては、連続切片の三次元再構築によってメカニカルストレスに応答する *OPN* 遺伝子の時間・空間的発現様相をより詳細に明らかにすることを目的とした。ラットに実験的な歯の移動を行うと圧迫側歯槽骨内の骨細胞、骨芽細胞、および bone lining cell において特異的に *OPN* 遺伝子が発現し、特に骨細胞においては発現細胞数の著しい増加が報告されている¹⁵⁾。本研究においても、メカニカルストレス負荷に伴って圧迫側と牽引側の両方で *OPN* 陽性骨芽細胞の増加が認められたが、*OPN* 陽性骨細胞

については圧迫側でのみ一過性の増加を認めた。このことより、骨細胞は圧迫刺激に応答して *OPN* 遺伝子を発現することが示された。また、増加した *OPN* 陽性骨細胞の周囲に破骨細胞の出現が確認されたことから、メカニカルストレスに応答して骨細胞と破骨細胞の間に生じる細胞間クロストークに、*OPN* が重要な役割を演じる可能性が示唆された。

破骨細胞およびその前駆細胞に対して *OPN* は、分化⁴⁵⁾、活性化⁴⁶⁾ および遊走能¹⁵⁾ に作用することが報告されているが、これらの研究は *in vitro* の実験によるものがほとんどであり、*in vivo* の実験系で示された例はあまり見当たらない。本研究では、*OPN* ノックアウトマウスに歯の移動実験を行い、メカニカルストレス負荷に伴い出現する破骨細胞を *wild-type* マウスとの比較によって解析し、*OPN* の破骨細胞に対する機能を検討した。メカニカルストレスを負荷していない *wild-type* マウスにおいては、破骨細胞が遠心側で比較的多く認められたが、これは生理的歯の移動によるものと考えられた。また、第一臼歯近心側、および遠心側の周囲歯槽骨内に存在する破骨細胞数の総計は、*OPN* ノックアウトマウスの方が *wild-type* マウスと比べて多かった。このことは、*OPN* ノックアウトマウスの骨中に存在する破骨細胞数が *wild-type* マウスと比較してわずかに多いという報告と一致している⁴⁷⁾。メカニカルストレスを72時間負荷した時、*wild-type* マウスでは圧迫側の破骨細胞数の急激な増加や、それに伴う骨吸収などの著しい組織学的変化を認めたが、*OPN* ノックアウトマウスでは上述のような変化はほとんど観察されなかった。この結果から、*OPN* ノックアウトマウスの破骨細胞に生じた何らかの機能異常が、骨吸収に障害をきたしたと考えられる。さらに、メカニカルストレス負荷に伴い破骨細胞前駆細胞と考えられる TRAP 陽性単核細胞の出現を多く認めたが、成熟した破骨細胞はごく僅かにしか認められなかったことを考え合わせると、*OPN* が破骨細胞の細胞融合に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。同様な破骨細胞の機能異常は、*mi/mi* mutant マウスでも報告されている^{48, 49)}。このマウスは、*mi* 遺伝子座にコードされる転写因子 MITF の突然変異が核移行能欠損、転写活性不全を通して破骨細胞の機能異常を引き起こし、大理石骨病となる⁵⁰⁾。MITF は *OPN* 遺伝子の重要な転写因子の一つであるため³⁴⁾、*OPN* に何らかの影響が生じ、それにより細胞融合の不全が起こったとも考えられる。逆に *OPN* ノックアウトマウスに卵巣摘除を行っても、骨吸収の促進はほとんどみられず骨粗鬆症となりにくいことが報告されていることから⁵¹⁾、*OPN* は破骨細胞の機能を介して大理石骨病や骨粗鬆症といった代謝性骨疾患に関与していることが推察される。

メカニカルストレスのなかでも *shear stress* に応答する遺伝子発現調節に、platelet-derived growth factor (PDGF) B 鎖遺伝子 5' 側の SSRE (塩基配列 GAGACC)

が関わることで、ウシの血管内皮細胞を用いた研究で明らかにされている²⁹⁾。SSREは、メカニカルストレスによって発現上昇するc-Fos^{52, 53)}, tissue plasminogen activator⁵⁴⁾, TGF- β 1^{55, 56)}, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)⁵⁷⁾などのプロモーター領域にも存在する。さらに、shear stressによって遺伝子発現が増加するmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)のプロモーター領域に存在する12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate responsive elementもメカニカルストレスによる遺伝子発現に関与していることが示され⁵⁸⁾, c-JunとFosファミリーのヘテロダイマーからなるactivator protein-1 (AP-1)がこの遺伝子発現に関わっていることが報告されている²⁶⁾。OPNプロモーター領域には、SSREに対応する塩基配列やAP-1結合部位⁵⁹⁾が存在しており、これらがメカニカルストレスに応答するOPNの遺伝子発現に深く関与している可能性が示唆されている。本研究において行われたGFP-OPN5.5マウスにおける歯の移動実験では、圧迫側の骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞におけるOPN遺伝子とGFP遺伝子の発現の局在一致が確認され、圧迫刺激に応答するOPNのプロモーター領域は5.5 kbp内に存在することが示された。牽引側では、一部局在が一致しない細胞も認められたが、これはOPN遺伝子とGFP遺伝子の検出感度の差によって生じた可能性が考えられる。したがって、今回の結果からメカニカルストレスに応答するプロモーターがOPN遺伝子上流5.5 kbpの領域に存在することが*in vivo*において初めて明らかにされた。さらに、GFP-OPN5.5マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞に周期的伸展刺激、あるいは圧縮刺激を負荷した際に、OPN遺伝子発現とGFP蛍光発現の上昇が同時に認められ、メカニカルストレスに応答するプロモーターがOPN遺伝子上流5.5 kbpの領域に存在することが*in vitro*の実験系においても示され、*in vivo*および*in vitro*の両面からメカニカルストレスに応答する領域の確認がなされたと考えられる。今後、より詳細な情報を得るためには、異なる長さのOPNプロモーター領域にレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスなど、さまざまな実験モデルを用いて検討を進める必要があると考えられる。

本研究において、メカニカルストレスに伴って引き起こされる骨リモデリングに、OPNが重要な役割を担っていることが示された。特に、メカニカルストレス負荷に伴って出現するOPN陽性骨細胞の周囲に破骨細胞が集積することや、OPNノックアウトマウスでは破骨細胞の融合に異常をきたすことを考えると、圧迫刺激を受けた骨細胞がOPNを発現し、それが破骨細胞の分化を誘導して骨吸収を引き起こす可能性が考えられる。OPNのプロモーター領域がさらに詳細に明らかとなれば、メカニカルストレスに関する骨代謝調節機構の一端が解明されると同時に矯正歯科臨床において用いる顎整形力や矯正力が生体に及ぼす影響をより明らかにし、今後の治

療法の発展に有益な情報を与える可能性が期待される。

結 論

マウスの歯の移動実験系により、メカニカルストレスに応答するOPNの発現、およびその機能を検討した。さらに*in vitro*においてGFP-OPN5.5マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞に周期的伸展刺激および圧縮刺激を負荷することにより、メカニカルストレスに応答するOPNの発現調節領域の解析を行い、以下の結果を得た。

- (1) マウスを用いた歯の移動実験系において、メカニカルストレスに応答して骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞にOPN遺伝子の発現を認めた。
- (2) メカニカルストレスに応答するOPN発現細胞の時間・空間的出現様相を明らかにした。
- (3) OPNノックアウトマウスにメカニカルストレスを加えても、破骨細胞の骨吸収能の低下により十分な骨リモデリングは認められなかった。
- (4) OPN遺伝子のメカニカルストレス応答領域が転写開始点上流5.5 kbp内に存在することが明らかとなった。
- (5) GFP-OPN5.5マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞は、周期的な伸展、圧縮刺激に応答してOPN遺伝子およびGFPを同時に発現した。

以上の結果より、OPNはメカニカルストレスに応答して骨細胞や骨芽細胞で発現し、破骨細胞分化に必須の役割を有していることが示された。また、OPN遺伝子のメカニカルストレス応答性プロモーターは、遺伝子上流5.5 kbp内に存在することが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御指導・御校閲を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面矯正学分野 森山啓司教授、本研究の実施に際して終始御指導を賜りました大阪大学大学院生命機能研究科時空生物学講座病因解析学研究室 野村慎太郎助教授に甚大なる謝意を表します。さらに、御校閲を戴いた徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子薬理学分野 吉本勝彦教授、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面外科学分野 長山勝教授に深謝致します。また、本研究の遂行に関して終始御指導と御協力を戴きました大阪大学大学院生命機能研究科時空生物学講座病因解析学研究室 東端裕司先生（現 名古屋市立大学大学院医学研究科病態外科学講座腎・泌尿器科学教室）ならびに研究の円滑な発展のために数々の御教示と御援助戴いた徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔顎顔面矯正学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Chambers T J, Evans M, Gardner T N, Turner-Smith

- A and Chow J W: Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading. *Bone Miner* 20, 167-178 (1993)
- 2) Mullender M G and Huiskes R: Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law. *J Orthop Res* 13, 503-512 (1995)
 - 3) Rubin C T, Gross T S, McLeod K J and Bain S D: Morphologic stages in lamellar bone formation stimulated by a potent mechanical stimulus. *J Bone Miner Res* 10, 488-495 (1995)
 - 4) Roberts W E, Goodwin W C Jr. and Heiner S R: Cellular response to orthodontic force. *Dent Clin North Am* 25, 3-17 (1981)
 - 5) King G J and Keeling S D: Orthodontic bone remodeling in relation to appliance decay. *Angle Orthod* 65, 129-140 (1995)
 - 6) Nomura S and Takano-Yamamoto T: Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol* 19, 91-96 (2000)
 - 7) Ogasawara A, Arakawa T, Kaneda T, Takuma T, Sato T, Kaneko H, Kumegawa M and Hakeda Y: Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP β , cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 276, 7048-7054 (2001)
 - 8) Chow J W, Fox S, Jagger C J and Chambers T J: Role for parathyroid hormone in mechanical responsiveness of rat bone. *Am J Physiol* 274, E146-E154 (1998)
 - 9) Inaoka T, Lean J M, Bessho T, Chow J W, Mackay A, Kokubo T and Chambers T J: Sequential analysis of gene expression after an osteogenic stimulus: c-fos expression is induced in osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 264-270 (1995)
 - 10) Saito M, Saito S, Ngan P W, Shanfeld J and Davidovitch Z: Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 99, 226-240 (1991)
 - 11) Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P and Bakhtiet M: Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *J Interferon Cytokine Res* 19, 1047-1052 (1999)
 - 12) Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P and Bakhtiet M: Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 119, 307-312 (2001)
 - 13) Denhardt D T and Noda M: Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 92-102 (1998)
 - 14) 藤田叔宏: 歯の移動に伴う歯槽骨改造現象における osteopontin mRNA の発現 - *in situ* hybridization 法による観察 口病誌60, 183-198 (1993)
 - 15) Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, Kawahata H, Inaguma N, Kitamura Y and Nomura S: Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14, 839-849 (1999)
 - 16) Chen J, Singh K, Mukherjee B B and Sodek J: Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption. *Matrix* 13, 113-123 (1993)
 - 17) Weinreb M, Shinar D and Rodan G A: Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by *in situ* hybridization. *J Bone Miner Res* 5, 831-842 (1990)
 - 18) Merry K, Dodds R, Littlewood A and Gowen M: Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modelling adult human bone. *J Cell Sci* 104, 1013-1020 (1993)
 - 19) Hirakawa K, Hirota S, Ikeda T, Yamaguchi A, Takemura T, Nagoshi J, Yoshiki S, Suda T, Kitamura Y and Nomura S: Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by *in situ* hybridization. *J Bone Miner Res* 9, 1551-1557 (1994)
 - 20) Tezuka K, Sato T, Kamioka H, Nijweide P J, Tanaka K, Matsuo T, Ohta M, Kurihara N, Hakeda Y and Kumegawa M: Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 911-917 (1992)
 - 21) Dodds R A, Connor J R, James I E, Rykaczewski E L, Appelbaum E, Dul E and Gowen M: Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res* 10, 1666-1680 (1995)
 - 22) Franzen A and Heinegard D: Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* 232, 715-724 (1985)
 - 23) Ikeda T, Nomura S, Yamaguchi A, Suda T and Yoshiki S: In situ hybridization of bone matrix proteins in undecalcified adult rat bone sections. *J Histochem Cytochem* 40, 1079-1088 (1992)
 - 24) Oldberg A, Franzen A and Heinegard D: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 8819-8823 (1986)
 - 25) Reinholt F P, Hultenby K, Oldberg A and Heinegard D: Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4473-4475 (1990)
 - 26) Denhardt D T and Guo X: Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7, 1475-1482 (1993)

- 27) Prince C W: Secondary structure predictions for rat osteopontin. *Connect Tissue Res* 21, 15-20 (1989)
- 28) Waldo C M and Rothblatt J M: Histologic response to tooth movement in the laboratory rat: procedure and preliminary observations. *J Dent Res* 33, 481-486 (1954)
- 29) Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron D T, Dewey C F Jr. and Gimbrone M A Jr.: Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 4591-4595 (1993)
- 30) Sato M, Iga H, Yoshioka N, Fukui K, Kawamata H, Yoshida H, Hirota S and Kitamura Y: Emergence of osteoblast-like cells in a neoplastic human salivary cancer cell line after treatment with 22-oxa-1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$. *Cancer Lett* 115, 149-160 (1997)
- 31) Noda M, Vogel R L, Craig A M, Pahl J, DeLuca H F and Denhardt D T: Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 9995-9999 (1990)
- 32) Inman C K and Shore P: The osteoblast transcription factor Runx2 is expressed in mammary epithelial cells and mediates osteopontin expression. *J Biol Chem* 278, 48684-48689 (2003)
- 33) Sato M, Morii E, Komori T, Kawahata H, Sugimoto M, Terai K, Shimizu H, Yasui T, Ogihara H, Yasui N, Ochi T, Kitamura Y, Ito Y and Nomura S: Transcriptional regulation of osteopontin gene in vivo by PEBP2 α A/CBFA1 and ETS1 in the skeletal tissues. *Oncogene* 17, 1517-1525 (1998)
- 34) Nomura S, Sakuma T, Higashibata Y, Oboki K and Sato M: Molecular cause of the severe functional deficiency in osteoclasts by an arginine deletion in the basic domain of *Mx* transcription factor. *J Bone Miner Metab* 19, 183-187 (2001)
- 35) Higashibata Y, Sakuma T, Kawahata H, Fujihara S, Moriyama K, Okada A, Yasui T, Kohri K, Kitamura Y and Nomura S: Identification of promoter regions involved in cell- and developmental stage-specific osteopontin expression in bone, kidney, placenta, and mammary gland: an analysis of transgenic mice. *J Bone Miner Res* 19, 78-88 (2004)
- 36) Liaw L, Birk D E, Ballas C B, Whitsitt J S, Davidson J M and Hogan B L: Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J Clin Invest* 101, 1468-1478 (1998)
- 37) Pavlin D, Goldman E S, Gluhak-Heinrich J, Magness M and Zadro R: Orthodontically stressed periodontium of transgenic mouse as a model for studying mechanical response in bone: The effect on the number of osteoblasts. *Clin Orthod Res* 3, 55-66 (2000)
- 38) Nomura S, Hirakawa K, Nagoshi J, Hirota S, Kim H M, Takemura T, Nakase N, Takaoka K, Matsumoto S, Nakajima Y, Takano-Yamamoto T, Ikeda T and Kitamura Y: Method for detecting the expression of bone matrix protein by *in situ* hybridization using decalcified mineralized tissue. *Acta Cytochem Histochem* 26, 303-309 (1993)
- 39) Harter L V, Hruska K A and Duncan R L: Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology* 136, 528-535 (1995)
- 40) Kubota T, Yamauchi M, Onozaki J, Sato S, Suzuki Y and Sodek J: Influence of an intermittent compressive force on matrix protein expression by ROS 17/2.8 cells, with selective stimulation of osteopontin. *Arch Oral Biol* 38, 23-30 (1993)
- 41) Toma C D, Ashkar S, Gray M L, Schaffer J L and Gerstenfeld L C: Signal transduction of mechanical stimuli is dependent on microfilament integrity: identification of osteopontin as a mechanically induced gene in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 12, 1626-1636 (1997)
- 42) Ishijima M, Rittling S R, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt D T and Noda M: Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of OPN. *J Exp Med* 193, 399-404 (2001)
- 43) Ishijima M, Tsuji K, Rittling S R, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt D T, Nifuji A and Noda M: Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 17, 661-667 (2002)
- 44) Proffit W R, Fields H W: Contemporary Orthodontics. Third ed. US, Mosby press, 1999, 298-308
- 45) Aitken C J, Hodge J M and Nicholson G C: Adenoviral down-regulation of osteopontin inhibits human osteoclast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 93, 896-903 (2004)
- 46) Ihara H, Denhardt D T, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, Hruska K A, Higashio K, Enomoto S, Nifuji A, Rittling S R and Noda M: Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem* 276, 13065-13071 (2001)
- 47) Chellaiiah M A, Kizer N, Biswas R, Alvarez U,

- Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling S R, Denhardt D T and Hruska K A: Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* 14, 173-189 (2003)
- 48) Kawaguchi N and Noda M: Mitf is expressed in osteoclast progenitors in vitro. *Exp Cell Res* 260, 284-291 (2000)
- 49) Luchin A, Purdom G, Murphy K, Clark M Y, Angel N, Cassady A I, Hume D A and Ostrowski M C: The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. *J Bone Miner Res* 15, 451-460 (2000)
- 50) Kataoka T R, Morii E, Oboki K, Jippo T, Maeyama K and Kitamura Y: Dual abnormal effects of mutant MITF encoded by Mi (wh) allele on mouse mast cells: decreased but recognizable transactivation and inhibition of transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 111-115 (2002)
- 51) Yoshitake H, Rittling S R, Denhardt D T and Noda M: Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8156-8160 (1999)
- 52) Wang W W and Howells R D: Sequence of the 5'-flanking region of the rat c-fos proto-oncogene. *Gene* 143, 261-264 (1994)
- 53) Renz M, Neuberg M, Kurz C, Bravo R and Muller R: Regulation of c-fos transcription in mouse fibroblasts: identification of DNase I-hypersensitive sites and regulatory upstream sequences. *EMBO J* 30, 3711-3716 (1985)
- 54) Feng P, Ohlsson M and Ny T: The structure of the TATA-less rat tissue-type plasminogen activator gene. Species-specific sequence divergences in the promoter predict differences in regulation of gene expression. *J Biol Chem* 265, 2022-2027 (1990)
- 55) Kim S J, Glick A, Sporn M B and Roberts A B: Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor- β 1 gene. *J Biol Chem* 264, 402-408 (1989)
- 56) Geiser A G, Kim S J, Roberts A B and Sporn M B: Characterization of the mouse transforming growth factor- β 1 promoter and activation by the Ha-ras oncogene. *Mol Cell Biol* 11, 84-92 (1991)
- 57) Degitz K, Li L J and Caughman S W: Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J Biol Chem* 266, 14024-14030 (1991)
- 58) Shyy J Y, Lin M C, Han J, Lu Y, Petrim M and Chien S: The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8069-8073 (1995)
- 59) Yamamoto S, Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K, Ishida T, Higuchi Y and Akizuki S: Structure of the osteopontin gene and its promoter. *Ann N Y Acad Sci* 760, 44-58 (1995)